



1972

384026

384026

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE <u>C07</u>
SUBCLASE <u>D</u>

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

a favor de

AKTIEBOLAGET ASTRA, de nacionalidad sueca, residente en Södertälje (Suecia), por: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE PENICILINAS HIPO-ALERGENICAS"

Memoria Descriptiva

Este invento se refiere a un método perfeccionado para la producción de penicilinas hipoalergénicas, mediante la acilación de ácido 6-aminopenicilánico, por una solución acuosa de una penicilin-acilasa libre de células.

5

Se sabe que muchos microorganismos, tanto bacterias como hongos, producen enzimas que pueden hidrolizar el enlace amida en la posición 6 de las penicilinas y que, en general, se denominan penicilin-acilasas o amidasas (para un resumen de ésto, véase J.M.T. Hamilton-Miller "Bacterio-



384026

10 logical Reviews 30(1966) 761). En la actual producción in-
dustrial de 6-APA, se usan de preferencia suspensiones de
células de E.coli que contienen una acilasa o amidasa. Sin
embargo, estos procedimientos tienen diversos inconvenien-
tes. Como el enzima es en gran medida intracelular, la pe-
15 nicilina, por necesidad, debe primero penetrar en los cuer-
pos de las células a fin de reaccionar con el enzima, lo que
dá como resultado una reacción más lenta. La cepa usada pue-
de contener también otros enzimas que inactiven la penicili-
na, o el 6-APA formado, separando el enlace de beta-lactama,
20 o que pueden contaminar el cultivo celular con los organismos
que producen tales enzimas. Como la acilasa constituye sólo
una parte pequeñísima del contenido celular, un procedimien-
to que use los organismos enteros tiene un inconveniente prác-
tico porque supone el empleo de grandes cantidades de mate-
25 rial que son inactivas en el proceso.

Otro inconveniente que se experimenta por el uso de
organismos enteros es que debe añadirse una operación adicio-
nal a la serie de procesos que conducen a la producción de pe-
nicilinas semi-sintéticas, a saber, la separación (por ejem-
30 plo, por filtración) de los organismos procedentes del líqui-
do de reacción en los cuales la cadena secundaria original ha
sido eliminada de las penicilinas biosintéticas. Otro incon-
veniente es la pérdida de ácido penicilánico causada en par-
te por adsorción sobre las células y en parte por degradacio-



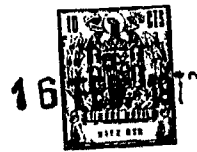
35 nes inducidas por materiales producidos durante el metabolis
mo celular. Todavía otro factor que tiende a causar proble-
mas asociados con el uso de células enteras para la prepara-
ción de ácido 6-aminopenicilánico a partir de penicilinas bio
40 sintéticas, es que la separación del ácido de los otros pro-
ductos de la reacción de escisión resulta bastante difícil.
Así, Batchelor y col. (Lancet I (1968) 1175) han informado
que el 6-APA obtenido por el empleo de células enteras puede
contener impurezas proteínicas capaces de provocar reacciones
alérgicas peligrosas en el hombre y el animal. Cuando se ha-
45 cen penicilinas de tales 6-APA contaminados, las impurezas
pueden ser retenidas en los productos y llegar a ser respon-
sables de muchas de las reacciones alérgicas observadas con
estas penicilinas (G.T. Stewart, Amer. Heart J. (1968) 429).
A fin de eliminar estas impurezas, el ácido 6-amino penicilá-
50 nico, o las penicilinas preparadas a partir de él, deben so-
meterse a procesos adicionales de separación que incluyen,
por ejemplo diálisis o filtración a través de un gel (Pat.
Canadiense No. 771.662). Se pierden de este modo grandes pro-
porciones del 6-APA o de la penicilina, como se demostró por
55 una recuperación de sólo 12 % de bencil-penicilina (Pat. bri-
tánica nº 1078847) y de 56 % de fenoximetil-penicilina (Pat.
británica número 1114311).

Todos estos obstáculos pueden evitarse cuando se
usa, de acuerdo con el presente invento, una preparación en-



60 zimática exenta de células o purificada. Así, los 6-APA
formados por el uso de una preparación enzimática exenta
de células o purificada de acuerdo con el invento para la
separación del enlace amídico en la posición 6 de las pen-
nicilinas, se obtienen con buenos rendimientos y están sus-
65 tancialmente exentos de impurezas proteínicas. Cuando el
6-APA preparado de este modo es acilado, se obtienen peni-
cilinas hipo-alérgicas con buenos rendimientos, sin puri-
ficación adicional. En la bibliografía se han descrito di-
versos intentos para obtener preparaciones enzimáticas pu-
70 rificadas a partir de cepas de E.coli. Sorkar y col. (Hin-
dustan Antibiotics Bull 4 (1961) 48, 152) trataron células
suspendidas en un tampón de fosfato con ondas ultrasónicas
y consiguieron una purificación de 25 veces por precipita-
ción fraccionada y cromatografía en columna. Holt y Stewart
75 (Nature 201 (1964) 824) obtuvieron una preparación enzimáti-
ca de baja pureza por secado por congelación y diálisis de
caldo de cultivo filtrado. Szentirmai (Acata Microb. Acad.
Scient. Hung 12 (1966) 395) obtuvo una purificación de 40
veces de enzima de E.coli. por precipitación con sulfato
80 de amonio, seguida por adsorción sobre gel de fosfato de
calcio y cromatografía en DEAE-celulosa de un extracto en
tampón de fosfato de células de E.coli. tratadas con ondas
ultrasónicas.

Sakguchi y Marao (Pat. japonesa nº 26050/64) ob-



85 tuvieron un rendimiento moderado de una preparación enzimática purificada a partir de E.coli extrayendo las células con tampón de borato durante un prolongado período de tiempo o durante un tiempo más corto en combinación con un tratamiento de ondas ultrasónicas. Del extracto, el enzima pudo obtenerse en forma sólida después de precipitación con sulfato amónico, diálisis y secado por congelación. Johnson y Hardcastle (Pat. EE.UU. nº 3297546) obtuvieron una solución de un enzima a partir de E.coli tratando el cultivo celular con un compuesto MX_2 , usualmente $Ca(NO_3)_2$ y un compuesto de amonio cuaternario, separando las células por filtración y poniéndolas en suspensión en agua durante algunas horas, y separando luego las células por filtración con tratamiento subsiguiente del filtrado con carbón activo.

90

95

Se sabe además que los enzimas contenidos en células bacteriales pueden ponerse en libertad por extrusión de suspensiones de células, a alta presión, a través de un pequeño orificio. Duerre y Ribí (Appl. Microbiol. 11 (1964) 467) estudiaron otros tipos de enzimas distintos de las amidasas de penicilina encontradas en E.coli y observaron que había de usarse alta presión, superior, a 1.050 kgs/cm^2 . para obtener la máxima liberación de los enzimas. A tales presiones, sin embargo, las paredes de las células se fragmentaban también y se solubilizaba gran parte del material de las células. Frazer (Nature 167 (1951) 33) encontró que las células

100

105

384026



1972

110 de E.coli podían romperse en pequeña escala cuando eran expulsadas desde una bomba por una presión de gas de 35-63 kgs./cm².

Hemos descubierto ahora que la acilasa de penicilina intracelular en el E.coli puede ser extraída del organismo en agua en escala de gran producción después de que las células, o las suspensiones de las mismas en agua o en una mezcla de agua y disolventes orgánicos, ha sido liberada rápidamente de una presión aplicada de al menos 35 kgm/cm², pero que no excede de la presión a que ocurre una disrupción excesiva de las células.

Así, el presente invento, en uno de sus aspectos proporciona un procedimiento para la producción de preparaciones de acilasa de penicilina a partir de E.coli, que comprende una fermentación en una forma conocida de cepas de E.coli productoras de tal enzima, retirar el líquido de cultivo y expulsar rápidamente el material celular a través de un estrecho orificio o hendidura por la aplicación de presión de, al menos, 35 kgs./cm² pero que no excede de la presión a que ocurre una disrupción excesiva de las células. Todavía a 210 kgs./cm², las células no son rotas en medida excesiva. El material expulsado es luego agitado con agua, eventualmente con adición de un disolvente orgánico y/o una base, como hidróxido sódico o trietilamina, para disolver el enzima.



16
384026

135 En una realización del presente invento, la reti-
rada del líquido de cultivo y la expulsión del material ce-
lular se efectúan simultáneamente en un separador centrífu-
go autolimpiador, hecho funcionar a una temperatura entre 0
y 50º, preferiblemente a 15-40º, en que el material celular
140 separado intermitentemente es expulsado al cabo de 0,05-1,0
seg., preferiblemente dentro de 0,1-0,5 seg., a través de
una hendidura periférica con una anchura de 0,1-1,5 mm., pre-
feriblemente 0,3-0,7 mm., por la aplicación de una presión
de 35 a 140 kgs./cm², preferiblemente 63-77 kgs/cm². Si fue-
145 ra deseable, el caldo es saturado con un disolvente orgánico
que tenga poca solubilidad en agua, tal como acetato de bu-
tilo, acetato de isobutilo o acetato de amilo, a fin de des-
truir el organismo y ayudar al proceso que se realiza en el
separador. Análogamente, es posible, si fuera deseable, lavar
150 el material celular con agua en el separador. El material ce-
lular expulsado es agitado a 10-50º, preferiblemente a 20-40º
durante 0,10-5,0 horas, adecuadamente 0,25-3,0 horas, y más
preferiblemente, 0,25-1,0 horas, con un agitador eficaz pa-
ra disolver el enzima, y posiblemente con adición en una con-
155 centración de 1,0-5,0 % de un disolvente orgánico inmiscible
con agua, tal como metilisobutil cetona, acetato de butilo,
acetato de isobutilo, acetato de amilo, benceno, tolueno o
cloroformo. A fin de facilitar la extracción del enzima des-
de el material celular expulsado, puede añadirse una base



160 inorgánica, tal como hidróxido sódico, hidróxido potásico o amoníaco o una base orgánica terciaria, tal como trietilamina o N-etilpiperidina, a la mezcla, para ajustar y sostener el pH a un valor entre 6,5 y 9,0 preferiblemente entre 7,0 y 8,5.

165 La solución enzimática así obtenida puede, posiblemente después de dilución con agua, ser libertada de cualquier material celular restante y otras impurezas sólidas por procedimientos habituales, tales como filtración o centrifugación, y eventualmente por una combinación de
170 ambos procedimientos y posiblemente con adición de agentes auxiliares decolorantes, clarificantes, filtrantes, tales como carbón activo, alúmina, polvo de celulosa, tierra de diatomeas u otros agentes sólidos débilmente adsorbentes. Un método preferido es el de eliminar la mayor parte del
175 material celular por centrifugación y filtrar el material que sobrenada.

Puede obtenerse una purificación adicional del enzima por acidificación de la solución acuosa a pH 3,0-6,0, preferiblemente de 4,0-5,0, separación del material
180 inactivo precipitado por filtración y reajuste del pH al valor original.

La acilasa de penicilina contenida en las soluciones acuosas exentas de células y, si se desea, parcialmente purificadas, que hemos mencionado, puede precipitar-



185 se por tratamiento de las soluciones con agentes, como ta-
ninos, que formen complejos escasamente solubles con pro-
teínas. En una forma preferida de este proceso, la solución
de enzimas es tratada a pH 4-6, adecuadamente a pH 4,5-5,5,
con tanino hasta una concentración final de 300-900 ppm en
190 presencia de agentes de quelación, como ácido etilendiamina
tetraacético, que forman complejos con iones de hierro. El
complejo enzima-tanino formado puede aislarse de una forma
usual, por ejemplo por filtración o centrifugación. Puede
lavarse y secarse y libertarse de agua, por ejemplo por se-
195 cado, especialmente por secado por congelación, o por tra-
tamiento con disolventes orgánicos miscibles con agua, como
la acetona. El complejo de tanino es una forma adecuada pa-
ra almacenar y transportar el enzima. Puede usarse también
directamente para la separación de la cadena secundaria de
200 penicilinas, como la bencil-penicilina, como se describe en
la solicitud de patente británica nº 33734/67.

La acilasa de penicilina contenida en el precipi-
tado de tanino puede ponerse en libertad en solución acuo-
sa por disolución del complejo en agua a pH 7-9, con prefe-
205 rencia 7,5-8,5. Alternativamente, el complejo puede tratar-
se con una mezcla de agua y un disolvente inmiscible con agua,
como n-butanol, a pH 4-7, con preferencia 4,5-5,5. Un tercer
método de separar el tanino consiste en tratar el complejo
enzima-tanino, en suspensión en agua con un permutador anió-



210 nico, como la DEAE-celulosa, que fija el tanino y pone en
libertad el enzima para que pase el agua. Las cantidades de
agua necesarias para estas operaciones son bastante menores
que las presentes en las soluciones enzimáticas originales
y de este modo se consigue una considerable concentración
215 de la actividad enzimática.

En otro aspecto del invento, la acilasa de penici-
lina contenida en cualquier solución a la que se ha hecho
referencia en lo que antecede puede concentrarse y purifi-
carse con ayuda de un permutador iónico. En una forma pre-
220 ferida, el enzima es absorbido sobre un permutador catióni-
co con estructura abierta, tal como SE-Sephadex (M^e R^e), CM-
celulosa o CM-Sephadex (M^e R^e) haciendo pasar la solución del
enzima, ajustada a pH 3,5-6, preferiblemente 4,0-5,0, a tra-
vés de una columna del permutador. Alternativamente, el per-
225 mutador puede ser añadido a la solución de enzima agitada. La
acilasa puede ponerse en libertad a partir del permutador ió-
nico por elución a pH 6,0-8,0 con soluciones tampón débiles,
tales como acetato amónico 0,2M o acetato de trishidroximetil-
amonio.

230 Con el fin de obtener preparaciones más puras del
enzima, las impurezas iónicas inorgánicas y de bajo peso mo-
lecular pueden separarse de las soluciones de enzima por dia-
lización contra agua. Alternativamente, las soluciones, si
es necesario despues de la concentración por evaporación a



235 una temperatura por debajo de 50° hasta una concentración adecuada de 25-100 mg. peso seco por ml., se someten a filtración por gel.

240 Las soluciones acuosas de enzima así obtenidas en cualquiera de las etapas anteriores son muy adecuadas para ser usadas directamente para la eliminación de las cadenas laterales de las penicilinas naturales, especialmente para la eliminación de la cadena lateral de bencil-penicilina.

245 En otro aspecto del presente invento, el enzima, tal como ha sido preparado hasta ahora, es aislado de solución acuosa en estado sólido por secado por congelación, secado por flotación, secado por pulverización o concentración en vacío o por precipitación de acuerdo con procedimientos conocidos. El proceso de aislamiento da como resultado un enzima sólido que posee una elevada actividad específica
250 y que es una forma muy conveniente para almacenaje o transporte. El uso de estas preparaciones enzimáticas sólidas, solubles en agua, tiene asimismo diversas ventajas técnicas, ya que hace posible trabajar con soluciones más concentradas que las utilizadas por los procedimientos conocidos que emplean suspensiones celulares.
255

El método preferido para aislar el enzima consiste en el secado por congelación de una solución de enzima a una temperatura entre -10 y +50°, preferiblemente entre 0 y 30°, o en el secado por flotación de la misma en una corriente de

384026



1972

260 aire a 10 a 55º, preferiblemente 35 a 45º.

Los enzimas y las soluciones de enzima purificados
obtenidos de acuerdo con este invento son muy adecuados y
ventajosos para la producción del ácido 6-amino-peniciláni-
co al eliminar la cadena secundaria de penicilinas, espe-
cialmente de bencil-penicilina. Los rendimientos y la pu-
reza de los productos son considerablemente mejores que los
obtenidos con los procedimientos conocidos, usando suspensio-
nes de células de E.coli.

Hemos descubierto también que el ácido 6-aminopeni-
cilánico preparado de acuerdo con este invento, contiene muy
pocas, o ninguna de las impurezas proteínicas con propieda-
des alergénicas obtenidas cuando se usan suspensiones de cé-
lulas de E.coli para su producción. Esto es de gran importan-
cia técnica, ya que de este modo es posible preparar así pe-
nicilinas con propiedades hipo-alergénicas directamente a par-
tir del 6-APA obtenido de acuerdo con este ihvento sin proce-
sos adicionales de purificación. Ejemplos de penicilinas con
propiedades hipo-alergénicas que pueden prepararse de este mo-
do son: alfa-fenoxietil-penicilina, alfa-fenoxipropil-penici-
lina, 2,6-dimetoxifenil-penicilina, 3-(o-clorofenil)-5-metil-
4-isoxazolil-penicilina, alfa-carbonilbencil-penicilina, alfa-
azidobencil-penicilina y alfa-aminobencil-penicilina.

La penicilin-acilasa de E.coli puede usarse también
para eliminar la cadena lateral de ésteres de penicilina, es-



384026

285 pecialmente de ésteres de bencil-penicilina, como se descri-
be en la solicitud de patenté británica nº 33734/67. Hemos
descubierto ahora que las preparaciones enzimáticas obteni-
das de acuerdo con este invento son muy adecuadas para es-
te procedimiento y más eficaces que las suspensiones de cé-
290 lulas de E.coli. anteriormente usadas. Hemos descubierto,
además, que las preparaciones enzimaticas de acuerdo con es-
te invento, son superiores a las suspensiones de celulas an-
teriormente usadas en la síntesis enzimática de penicilinas
a partir de ácido-6-amino-penicilánico y precursor de cade-
295 na lateral (W.K. Kaufman y col., Antimicrobial Agents Ann.,
1960, 1).

Las preparaciones enzimáticas purificadas obte-
nidas de acuerdo con este invento son materiales de parti-
da adecuados para la modificación química del enzima, dan-
do como resultado productos con mejores propiedades en lo
300 que respecta a actividad y/o al rendimiento técnico. Así,
el enzima puede reaccionar con materiales polímeros activa-
dos, tales como, por ejemplo, polisacáridos tratados con bro-
muro de cianógeno, para dar productos en que el enzima que-
305 da fijado a un soporte polímero. La actividad enzimática es
retenida en tales productos que son ventajosos en su uso pa-
ra la separación de penicilinas, ya que pueden recuperarse de
la solución de reacción por medios sencillos, por ejemplo por
filtración. La preparación de enzima-polímero puede usarse



384026

310 también en columnas para la producción continua de 6-APA
haciendo pasar la solución de penicilinas a través de la
columna.

Esta solicitud, que corresponde a la depositada
en Inglaterra el día 3 de diciembre de 1968, bajo el núm
315 57373/68, se acoge a los beneficios del artículo 51 del
vigente Estatuto sobre la Propiedad Industrial y del artí-
culo 4º del Convenio de la Unión.

R E I V I N D I C A C I O N E S
=====

1).- Un procedimiento para la producción de peni-
320 cilinas hipo-alergénicas, tales como alfa-fenoxietil-penici-
lina hipo-alérgica, alfa-fenoxipropil-penicilina hipo-aler-
génica, 2,6-dimetoxi-fenilpenicilina hipoalérgica, 3-(a-
clorofenil)-5-metil-4-isoxasolpenicilina hipoalérgica, alfa-
carbonilbencil-penicilina hipoalérgica, alfa-ácido-bencil-
325 penicilina hipoalérgica, alfa-amino-bencil-penicilina hipo-
alérgica, bencil-penicilina hipoalérgica, caracterizado
por comprender la acilación de ácido 6-aminopenicilánico pre-
parado por degradación enzimática de una penicilina natural
por una solución acuosa de una penicilin-acilasa libre de ce-
330 lulas obtenida por el método reivindicado en la patente prin-
cipal número 363.592.

2).- "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE PENI-

h.g.

384026

16



CILINAS HIPO-ALERGENICAS"

335 Esta memoria consta de 15 hojas foliadas y mecanografiadas por un solo lado de sus caras.

Madrid, 26 de septiembre de 1970

Pablo Agudo Obregón

P. P.